Dott. G. SERAFINI

Esperienze sul sarcoma del ratto

ROMA

TIPOGRAFIA DEL SENATO

1917

Dott. G. SERAFINI

Esperienze sul sarcoma del ratto

ROMA
TIPOGRAFIA DEL SENATO

1917

Estratto da *Tumori*, Anno V, fasc. III

CLINICA CHIRUR. OPERATIVA DELLA R. UNIV. DI TORINO

Diretta dal Prof. Sen. A. Carle

Dott. G. SERAFINI

ASSISTENTE, DOCENTE

Esperienze sul sarcoma del ratto.

I. — Sull'influenza della legatura dei vasi splenici sullo sviluppo del sarcoma del ratto.

In una paziente operata di resezione del corpo del pancreas per carcinoma [1] siamo stati costretti a legare l'arteria splenica recisa nell'atto della resezione del neoplasma. Dopo più di due anni dall'intervento il tumore non era ancora recidivato contro ogni nostra previsione. Ho voluto ricercare coll'esperimento se la legatura dei vasi della milza non possa per avventura influenzare lo sviluppo del sarcoma del ratto. In seguito alla legatura dei vasi dell'ilo della milza e dei *vasa breviora* si deve provocare la necrosi del tessuto splenico ed il riassorbimento di esso. Ora noi sappiamo che il riassorbimento del parenchima della milza riduce il potere di attecchimento del sarcoma del topo sia quando la poltiglia di milza viene inoculata contemporaneamente ed insieme alla poltiglia di tumore (A. Donati [2], Frankl [3]) che quando viene iniettata fuori della sede del tumore (Oser e Pribram [4]). Di più l'azione antiblastica della milza è stata messa in luce dalle ricerche di Fichera [5], Braunstein [6], Lewin [7] e Meidner, Biach e Weltmann [8], Cimoroni [9], Brancati [10], Mazza [11], Apolant [12]. I dati sperimentali già acquisiti conferivano un certo interesse alle ricerche

sulla legatura dei vasi splenici, interesse che appariva tanto maggiore se si poneva mente al reperto clinico sovramenzionato.

È possibile legare tutti i vasi splenici nel ratto se si solleva delicatamente l'organo e si passa un laccio sotto di esso raccogliendo nel nodo tutti i vasi ossia arteria e vena splenica e *vasa breviora*. La milza così trattata si arrotola a guisa di un O. Dopo due mesi l'ho trovata costituita da una massa bruniccia della grossezza di un seme di granturco, aderente ai visceri circostanti. All'esame istologico si sono riscontrati residui di tessuto splenico con follicoli abbastanza ben conservati; in qualche caso il tessuto si era trasformato in un nodetto di connettivo compatto. Allorquando ho legato soltanto l'ilo splenico lasciando integri i *vasa breviora* o viceversa, lo splene si è ridotto di volume ma non ha presentato alterazioni istologiche degne di nota.

1ª serie. Ho fatto uso per le mie ricerche di un ceppo di sarcoma fusocellulare proveniente dall'Istituto di patologia generale del chiarissimo prof. Morpurgo e conservato per trapiantamento nel laboratorio della Clinica.

Ho inoculato sotto la cute del dorso 12 ratti. In otto vi fu attecchimento. Dopo 40 giorni il tumore aveva raggiunto la grossezza all'incirca di una piccola noce. In quattro animali ho legato con tutte le regole dell'asepsi e senza anestesia tutti i vasi splenici. Dopo sette giorni, due dei quattro ratti operati e nei quali il tumore aveva continuato ad aumentare di volume, muoiono. Dopo altri 23 giorni muore un terzo animale operato portatore di un tumore molto sviluppato. Dopo altri quattro giorni muore il quarto che presenta esso pure un tumore molto voluminoso. In tutti questi animali non si trovò all'autopsia la ragione della morte. Nei quattro controlli il tumore acquistò un cospicuo sviluppo.

Peso dei tumori dei ratti con vasi splenici allacciati: gr. 21, gr. 18, (morte sette giorni dopo l'operazione), gr. 64 (morte dopo 30 giorni), gr. 58 (morte dopo 34 giorni).

Peso dei tumori dei controlli: gr. 42, 38, 46, 29. I tumori erano in ambedue i gruppi degli animali, carnosi con piccole cisti.

2ª serie. Si inoculano sei ratti del medesimo lotto. Dopo 45 giorni

uno di essi presenta un tumore della grossezza di una nocciuola, negli altri cinque il tumore è grosso come una noce. Si legano tutti i vasi splenici a quattro di questi animali e precisamente a tre portatori di tumore della grossezza di una noce ed al ratto portatore di tumore piccolo. Due ratti con tumore della grossezza di una noce sono tenuti come controllo. Due giorni dopo l'operazione muore il ratto con tumore della grossezza di una noce; otto giorni dopo l'operazione muore il ratto con tumore grosso come una noce. In ambedue questi animali non si ritrova all'autopsia la causa della morte. Sessanta giorni dopo l'operazione si sacrifica il ratto che prima di essa presentava tumore della grossezza di una nocciuola e che era aumentato fino a diventare tre o quattro volte più voluminoso di prima. Si sacrifica anche l'ultimo dei quattro ratti operati che è portatore di un tumore enorme cistico e necrotico. I tumori dei due controlli sono essi pure voluminosi, cistici e necrotici. Peso dei tumori dei quattro ratti con vasi splenici allacciati: gr. 25 (morte dopo due giorni), gr. 31 (morte dopo otto giorni), gr. 59 (ucciso dopo 60 giorni), gr. 78 (ucciso dopo 60 giorni). Peso dei tumori dei due ratti controllo, gr. 48, gr. 53.

Da queste esperienze risulta che quando a topi portatori di sarcoma si legano i vasi splenici la mortalità è grande, analogamente a quanto accade per la splenectomia. Naturalmente ci siamo accertati che la semplice laparotomia correttamente praticata non è causa di morte. Nei casi di sopravvivenza, sembra che la legatura dei vasi splenici possa permettere uno sviluppo del tumore maggiore che nei controlli. Queste esperienze costituiscono una conferma del potere antiblastico della milza messo oramai in luce da molti ricercatori. I risultati sono meno netti che nella splenectomia forse perchè nella legatura dei vasi splenici la frequente sopravvivenza di frammenti di parenchima splenico permette che l'azione antiblastica della milza possa ancora in parte esplicarsi. Queste esperienze pongono anche in rilievo il fatto che il riassorbimento del tessuto splenico caduto in necrosi asettica in seguito alla legatura dei vasi, non ha influenzato lo sviluppo del tumore, sviluppo che ci è sembrato aumentato rispetto ai controlli quando la milza scomparsa nella sua totalità o fortemente ridotta non ha più potuto esplicare la sua

azione antiblastica. Come conclusione riguardante il caso clinico sopra riferito dobbiamo ammettere che la lunga sopravvivenza della nostra operata è da attribuirsi a favore soltanto dell'operazione esaurientemente praticata. La milza non poteva entrare per nulla nel risultato felice del caso. È nota infatti l'affermazione di Kehr e Körte secondo i quali l'arteria e la vena splenica si possono legare senza che la milza ne soffra nella sua nutrizione perchè le anastomosi coi *vasa breviora* provvedono all'ulteriore nutrizione di essa. Se la nutrizione ne soffrisse si avrebbe una diminuzione del potere antiblastico dell'organo e quindi il soggetto sarebbe maggiormente predisposto ad una recidiva.

II. — Sull'influenza del siero di animali immunizzati con tessuto splenico, cerebrale ed epatico sullo sviluppo del sarcoma del ratto.

Con le seguenti esperienze ho ricercato se fosse possibile agire sullo sviluppo del sarcoma del ratto iniettando in animali portatori di tumori il siero di ratti trattati con tessuti diversi e precisamente con tessuto splenico, cerebrale ed epatico.

1. *Siero di animale immunizzato con tessuto splenico.*

Tre milze di ratto asportate asetticamente vengono spappolate in soluzione fisiologica sterile dentro un mortaio con polvere di vetro. Dopo decantamento si iniettano sotto cute tre ratti con tre c.c. ciascuno di questo liquido. Dopo dieci giorni, i tre animali che non avevano dato alcun segno di sofferenza, sono salassati e il siero di ciascuno di essi è iniettato sotto la cute di tre ratti portatori di sarcoma il quale in due era della grossezza di un seme di granturco ed in un terzo, della grossezza di una piccola nocciuola. Dopo diciotto giorni, in ciascuno dei due ratti già iniettati si inietta metà del siero di un ratto trattato nella maniera dei precedenti. Dopo altri dieci giorni si osserva che il ratto il quale ha subito una sola iniezione di siero presenta tumore grosso come una piccola noce, che i due ratti i quali erano stati trattati due volte con siero hanno essi pure tumore grosso

come una piccola noce. Dopo altri dodici giorni essi tutti hanno raggiunto la grossezza di una bella noce. Dopo altri ventidue giorni, gli animali vengono sacrificati. Il loro tumore è grosso come un uovo. (Vedasi tabella). Nè sostanzialmente in modo diverso si comportano altri due ratti di una seconda serie di esperienze: due milze di ratto si spappolano sterilmente in soluzione fisiologica come per la prima serie e si iniettano sotto cute due ratti con tre c.c. ciascuno di questo liquido. Dopo dieci giorni gli animali vengono salassati e il siero è iniettato in un ratto con tumore della grossezza di due semi di granturco ed in un altro ratto con tumore grosso come una piccola nocciuola. Dopo diciotto giorni i tumori risultano ambedue grossi come una piccola noce. Gli animali vengono di nuovo iniettati con siero di ratto trattato dieci giorni prima con emulsione di milza. Dopo altri dodici giorni ambedue i tumori sono grossi come una bella noce. Dopo altri ventidue giorni sono del volume di un uovo di gallina (Vedasi tabella).

2. *Siero di animale immunizzato con sostanza cerebrale.*

Si prepara un'emulsione di tre cervelli di ratto in soluzione fisiologica come si era fatto per la milza. Dopo decantamento si iniettano tre c.c. di liquido in ciascuno dei tre ratti i quali vengono salassati dopo dieci giorni. Il siero di questi animali viene iniettato in tre ratti con tumore, uno della grossezza di una bella nocciuola e due di una piccola nocciuola. Dopo diciotto giorni si ripete il medesimo trattamento: i tumori hanno acquistato la grossezza di una piccola noce. Dopo altri dodici giorni sono grossi come una bella noce. Dopo altri ventidue giorni sono diventati enormi (Vedasi tabella).

3. *Siero di animali immunizzati con tessuto epatico.*

Si prepara una emulsione di gr. sei di tessuto epatico in soluzione fisiologica come si era fatto per la milza ed il cervello. Dopo decantamento si iniettano tre c.c. di questa emulsione in ciascuno di tre ratti i quali vengono salassati dopo dieci giorni. Il siero viene iniettato in

ciascuno dei tre ratti portatori, l' uno di un tumore grosso come una noce e due, grosso come una nocciuola. Dopo diciotto giorni si ripete il medesimo trattamento: dei tumori, uno è diventato grosso come un uovo e due sono della grossezza di una noce. Dopo altri dodici giorni si ha: un tumore è grosso come un uovo e due sono grossi come una noce. Dopo altri ventidue giorni i tumori sono grossi come una patata.

Tutti i ratti ed i controlli di queste tre serie di esperienze furono scelti di sesso mascolino. Tre ratti controllo di queste tre serie di esperienze compiute contemporaneamente nei medesimi periodi di tempo, presentano tumori delle seguenti dimensioni: nocciuola, piccola nocciuola, due semi di granturco.

Dopo diciotto giorni, ossia al momento della reiniezione dei ratti dei tre gruppi precedenti, si ha:

grossa nocciuola, idem, idem. Dopo altri dodici giorni: grossa noce, piccola noce, idem. Dopo altri ventidue giorni: piccolo uovo, idem, idem.

Riassumendo:

	Grossezza del tumore al momento della prima iniezione	dopo 18 giorni reiniezione	dopo 12 giorni reiniezione	dopo 22 giorni al momento del sacrificio degli animali
Siero di ratto immunizzato con tessuto splenico. 5	2 semi di granturco	piccola noce	grossa noce	gr. 70 - 68 - 54 - 78 - 59
	idem	idem	idem	
	piccola nocciuola	idem	idem	
	idem	idem	idem	
	idem	idem	idem	
Siero di ratto immunizzato con sostanza cerebrale. 3	nocciuola	piccola noce	grossa noce	gr. 96 - 80 - 88
	piccola nocciuola	idem	idem	
	idem	idem	idem	

Grossezza del tumore al momento della prima iniezione		dopo 18 giorni reiniezione	dopo 12 giorni reiniezione	dopo 22 giorni al momento del sacrificio degli animali
Siero di ratto immunizzato con tessuto epatico. 3	noce	noce	grosso uovo	gr. 89 - 76 - 69
	nocciuola	idem	grossa noce	
	idem	uovo	idem	
Controlli. 3	nocciuola	nocciuola	grossa noce	gr. 48 - 40 - 34
	piccola nocciuola	grossa nocciuola	piccola noce	
	2 semi di granturco	idem	idem	

E precisamente: diciotto giorni dopo la prima iniezione dei sieri, i tumori più voluminosi appartengono a ratti iniettati con siero di animali immunizzàti con tessuto epatico, poi vengono per grossezza quelli iniettati con siero di animali immunizzati con sostanza cerebrale e con tessuto splenico senza differenza apprezzabile tra di loro ed ultimi, gli animali di controllo.

Al momento del sacrificio, cioè sessantasei giorni dopo l' inizio del trattamento, i tumori più voluminosi appartengono ai ratti iniettati con siero anticerebrale (complessivamente, gr. 264), subito dopo vengono quelli trattati con siero antiepatico (complessivamente, gr. 234), poi quelli iniettati con siero antisplenico (complessivamente, gr. 216 per i tre tumori più voluminosi) ed ultimi i controlli (complessivamente gr. 122).

Adunque, i sieri dei ratti immunizzati con tessuto epatico, splenico e con sostanza cerebrale, iniettati a più riprese nei ratti portatori di sarcoma, permettono un maggiore sviluppo del tumore stesso rispetto ai controlli.

Come risulta da quanto è stato rilevato da molti autori, la funzione della milza essendo antiblastica, ci sembra che l'azione del siero

di ratto immunizzato con parenchima splenico iniettato nel ratto portatore di sarcoma, sia quella di ostacolare la funzione della milza e nel caso speciale, il suo potere antiblastico. Per quanto riguarda il siero di animali immunizzati con tessuto epatico, appare dalle nostre esperienze come l'iniezione di esso nel topo portatore di sarcoma agevoli lo sviluppo del neoplasma. Ne verrebbe, per analogia a quanto si osserva per la milza, che anche il parenchima epatico deve possedere, tra le altre funzioni, anche una antiblastica. In verità, per la milza le prove sono molto numerose e furono date specialmente dalla splenectomia in ratti portatori di sarcoma, dalla inoculazione di poltiglia di sarcoma nel parenchima splenico o nel peritoneo, dalla inoculazione di poltiglia di tumore commista a poltiglia di milza. Anche per il fegato, una mediocre azione antiblastica è ammessa da varî ricercatori: Brancati [13], dallo studio dei risultati degli innesti di sarcoma nei varî organi, ha potuto attribuire resistenza verso l'innesto a visceri riccamente irrorati o elaboratori del sangue, massima alla milza, mediocre al fegato, nulla ai testicoli, concordando con i reperti di Borrel e Bridré, Schöne, Braunstein e di Brancati stesso secondo i quali i topi iniettati con tessuto splenico contrastano l'innesto dei tumori, quelli trattati con sostanza epatica o con sangue mostrano una discreta resistenza, mentre nessuna ne conferiscono i costituenti testicolari. Sarebbe interessante ricercare se la somministrazione o la iniezione di sostanze che ledono la funzionalità epatica possono avere qualche influenza sull'attecchimento e sull'accrescimento del sarcoma del ratto. Si potrebbe così forse contrastare all'opinione di Koenigsfeld [14] secondo la quale i risultati ottenuti con gli esperimenti di immunizzazione nei tentativi di cura dei tumori maligni sono dovuti non a fatti specifici, ma a fenomeni generali e comuni per i varî mezzi adoperati (reazione febbrile provocata, leucocitosi destata, albumine introdotte, costituenti normali dei sieri usati).

Intanto riceviamo così indirettamente, anche dalle nostre ricerche, l'impressione che la proprietà antiblastica, oltre che dalla milza, possa essere posseduta in parte anche dal parenchima epatico e dal cerebrale.

I reperti di queste nostre ricerche sono poi degni di attenzione per rispetto ai concetti espressi da Abderhalden [15] circa la negatività delle

ricerche sieroterapiche da animali trattati preventivamente con tessuti od estratti di tumore e sottoposti a salasso dopo molti giorni. Essa, secondo questo autore, sarebbe dovuta al fatto che la immissione e la elaborazione dei fermenti è rapidissima e transitoria a differenza di ciò che avviene nella immunizzazione attiva.

Nei nostri esperimenti il salasso è stato praticato dopo dieci giorni dalla avvenuta immunizzazione degli animali con tessuto splenico, cerebrale ed epatico, e le iniezioni furono tre. Malgrado ciò l'azione dei supposti fermenti è stata nulla, anzi i sieri provenienti dagli animali immunizzati si sono dimostrati piuttosto eccitatori dei blastomi. A spiegare questi risultati mi sembra si possa emettere l'ipotesi che questi sieri non agiscano per opera di fermenti più o meno labili ma ostacolino una funzione di organi e di tessuti normali (milza, fegato, cervello) attenuandone il potere oncolitico.

III. — Sull'iniezione di tessuto sarcomatoso sterilizzato in ratti portatori di tumore.

Niesfield [16] ha trattato tre casi molto avanzati di cancro della mammella con estratto neoplastico del tumore asportato, ottenendo in un caso la riduzione della recidiva e la scomparsa dei dolori, in un altro la scomparsa di una voluminosa ghiandola aderente al fascio nerveo vascolare dell'ascella; il terzo è rimasto senza recidiva.

Ho preparato l'estratto neoplastico di sarcoma di ratto nel modo indicato da Niesfield: alcuni grammi di tessuto fresco (otto) vennero ridotti in piccoli frammenti e pestati insieme con sabbia sterile e soluzione 1 su 80 di acido fenico. Si decantò l'emulsione durante 24 ore ed il liquido così ottenuto è stato riscaldato a bagno maria lentamente sino all'ebollizione. L'emulsione che aveva colorito roseo acquistò dopo l'ebollizione, un colore caffè-latte. Messa in ghiacciaia la preparazione, viene usata dopo 24 ore. E precisamente:

1° Si iniettarono due c.c. di questo liquido ad un ratto portatore di grosso tumore. Dopo qualche minuto insorse tremito e collasso. Morte dopo due ore. Peso del tumore gr. 35.

2° Un secondo animale si comportò nello stesso modo e morì dopo un' ora. Peso del tumore gr. 50.

3° Un terzo animale venne colpito dopo la iniezione da tremito e collasso, rimase agonizzante durante due ore circa e poi si rilevò. Tumore della grossezza di un uovo.

4° Un quarto ratto subì l'iniezione di un c. c. di liquido non manifestando alcun disturbo. Tumore della grossezza di una bella noce.

5° In un quinto ratto si iniettò mezzo c.c. di liquido. Nessun disturbo. Tumore come il precedente.

6° In un sesto ratto si iniettò mezzo c.c. di liquido. Nessun disturbo. Tumore come il precedente. Cinque giorni dopo la prima iniezione si inietta nei quattro animali sopravvissuti, mezzo c.c. di estratto neoplastico fabbricato 24 ore prima. L'iniezione è stata ben tollerata.

Otto giorni dopo la prima iniezione i tumori non sembrano affatto modificati.

Il giorno dopo, altra iniezione di mezzo c.c. di estratto a ciascuno dei quattro animali: nessun disturbo. Dopo altri otto giorni, altra iniezione di due c.c.: nessun disturbo. I tumori sono molto voluminosi.

Un mese dopo la prima iniezione, gli animali marasmatici, con grossi tumori, vengono sacrificati. I tumori sono mollicci, fluttuanti, cistici e pesano rispettivamente, gr. 56, 48, 59, 41 con poca differenza dal peso del tumore di quattro controlli.

Adunque, questo estratto neoplastico non ha dato risultato apprezzabile sullo sviluppo del sarcoma del ratto.

La dose di due c.c. ha provocato in tre animali tremito e collasso ed in due la morte. Questi accidenti non sono dovuti all' acido fenico contenuto nell' estratto, perchè l'iniezione in due ratti sani ed in due ratti portatori di tumore, di due c.c. di soluzione fenica 1 su 80 non ha provocato alcun disturbo negli animali. I fenomeni sono quindi dovuti alla sostanza tossica del tumore.

Inoltre, ho iniettato in due ratti sani due c.c. dell' estratto e gli animali hanno tollerato bene l'iniezione. Adunque, l' estratto neoplastico è causa dell' insorgenza di gravi fenomeni soltanto nel ratto portatore

di tumore e solo per opera della sostanza tossica del tumore. Di più la tolleranza all'estratto aumenta da parte dell'animale, dopo parecchie iniezioni; infatti due c.c. che sono stati mortali alla prima iniezione in due ratti su tre, non hanno causato alcun disturbo dopo quattro iniezioni di un c.c. e di mezzo c.c.

IV. — Tentativi di sensibilizzazione del sarcoma di ratto all'irradiazione mediante iniezioni intraneoplastiche di una emulsione di lecitina.

Le esperienze di Schwarz e Schäper [17] hanno dimostrato che le iniezioni sottocutanee di lecitina irradiata (1–2 gr. di lecitina sottoposte per 2-3 giorni all'irradiazione) sono riassorbite senza dar luogo ad alcun fenomeno, quelle intra cute provocano fenomeni analoghi a quelli dovuti all'applicazione diretta del radium sulla cute, vale a dire, ad arrossamento circoscritto, a tumefazione e, dopo due o tre giorni, a formazione di vescicole oppure a focolai di necrosi, mentre nelle iniezioni di semplice emulsione di lecitina, questi fenomeni non compaiono.

Il meccanismo d'azione della irradiazione sulla cellula vivente sarebbe fondato sulla sensibilizzazione della lecitina intracellulare, anzi, secondo Müller, esisterebbe persino un rapporto costante tra la ricchezza in lecitina della cellula e gli effetti biochimici ottenuti dalla irradiazione. L'alta percentuale di lecitina contenuta nei neoplasmi (5,8 per cento) sarebbe la causa della radiosensibilità delle cellule tumorali. La tecnica radiologica moderna ha studiato il metodo di ipersensibilizzazione cellulare basato sulla combinazione di due effetti terapeutici prodotti dalla introduzione nell'organismo di sostanze speciali capaci col loro sdoppiamento sotto l'azione dei raggi primari, di avere un'influenza preponderante sulla distruzione dei tumori. Dalla Relazione del professore Bertolotti [18] al VII Congresso internazionale di elettrologia e di radiologia medica (Lione, 27-30 luglio 1914), sembra che siano stati ricavati alcuni vantaggi col metodo della iniezione di lecitina e di colina per la decomposizione che queste sostanze subiscono nell'interno dei tessuti e per le reazioni a distanza che esse producono. Si noti ancora,

che iniezioni intraneoplastiche di lecitina hanno permesso di constatare che questo lipoide può determinare il rallentamento di sviluppo o la regressione del carcinoma del ratto ed ostacolare la produzione e lo sviluppo di metastasi (Robertson e Burnett [19]).

La lecitina poi dà luogo alla colina come prodotto di scissione, la quale agisce sul tumore coadiuvando l'azione ipersensibilizzante del tumore ai raggi provocata dalla lecitina. In base a queste vedute ho istituito le seguenti esperienze:

Diciotto ratti maschi bene sviluppati, portatori di tumori di discreta grossezza vengono divisi in tre gruppi di sei animali ciascuno e così trattati:

1° In un primo gruppo di sei ratti infiltravo con una fine emulsione di lecitina, per mezzo di una siringa di Pravaz, la compagine del tumore. Ho fatto uso di lecitina Erba che emulsionavo stemperandola sterilmente a lungo in soluzione fisiologica. Due grammi di lecitina emulsionati in 10 c.c. di soluzione fisiologica servivano per infiltrare i tumori di sei ratti. L'iniezione intraneoplastica veniva eseguita colle maggiori cautele asettiche diffondendo l'emulsione lentamente nelle varie zone del neoplasma. Il tumore di questi sei ratti fu infiltrato quattro volte colla medesima dose di emulsione di lecitina e cioè ogni volta prima di sottoporre i ratti alla irradiazione, come dirò in appresso.

2° In un secondo gruppo di sei ratti si infiltrò il tumore colle medesime modalità degli animali del gruppo precedente. I sei animali non vennero sottoposti alla irradiazione.

3° Il terzo gruppo di sei ratti portatori di tumore è stato sottoposto alle medesime dosi di raggi X dei ratti del gruppo primo.

I ratti del primo e terzo gruppo opportunamente fissati sopra una assicella subirono una seduta di irradiazione del tumore, della durata di quindici minuti, 9 Bauer, filtro di 4 mm.; dopo dieci giorni, altra seduta di dieci minuti, 9 Bauer, filtro di 4 mm.; dopo cinque giorni, altra seduta di dieci minuti, 9 Bauer, filtro di 2 mm.; dopo nove giorni, ultima seduta di dieci minuti, 9 Bauer, filtro di 1 mm.

Due giorni dopo l'ultima seduta si osserva:

a) ratti il cui tumore venne irradiato:

1° tumore molliccio grosso come nocciuola.

2° » » » » »

3° » » » » »

4° » » » » »

5° » » due semi di granturco.

6° » » » » »

b) ratti il cui tumore infiltrato di emulsione di lecitina venne irradiato:

1° tumore molliccio grosso come piccola noce.

2° » » » » » »

3° » » » » » noce

4° » » » » » »

5° » » » » grossa noce.

6° » » » » » »

c) ratti il cui tumore infiltrato di emulsione di lecitina non venne irradiato. Il tumore si presentò nei sei animali grosso come una noce, molliccio, cistico. Ho dovuto sacrificare gli animali dopo dodici giorni perchè il loro deperimento era molto grande per tutte e tre le serie.

Si trovò che i ratti, il cui tumore integro era stato irradiato, presentavano in due casi un tumore piccolissimo, con cute ulcerata, duro; negli altri quattro il tumore era della grossezza di una nocciuola, molle, in parte cistico, di aspetto lardaceo; che i ratti, il cui tumore era stato semplicemente infiltrato di emulsione di lecitina, erano portatori di un enorme tumore cistico, costituito da una corteccia bianco-rosea, lardacea, corteccia che racchiudeva una poltiglia giallo-scura ed un liquido caffeano; che gli animali il cui tumore dopo l'infiltrazione di lecitina era stato irradiato, erano portatori di un tumore press'a poco della grossezza dei tumori della serie precedente ed ulcerati in tutti e sei gli animali. Esso era costituito da una buccia sottilissima di tessuto lardaceo avvolgente una sostanza scuriccia necrotica ed un liquido nerastro. Riassumendo: i tumori semplicemente irradiati erano piccoli, ulcerati in due casi, contenenti piccole cavità cistiche; quelli semplicemente infiltrati di lecitina erano molto voluminosi, con grandi cisti;

press'a poco della stessa grossezza, con grandi cisti, ulcerati, erano i tumori infiltrati di lecitina ed irradiati. In essi poi la buccia di tessuto neoplastico ben conservato appariva più sottile che non nei tumori semplicemente infiltrati. Il criterio della grossezza e dei pesi dei tumori nelle tre serie di ratti non poteva essere preso in considerazione perchè in causa della infiltrazione di emulsione di lecitina praticata nel parenchima del sarcoma, erano state provocate delle emorragie le quali avevano dovuto influenzare la nutrizione, la grossezza e quindi il peso dei tumori. Era quindi naturale che si dovesse porre grande attenzione all'esame istologico di frammenti degli strati più superficiali dei tumori per riconoscere le alterazioni protoplasmatiche e nucleari a tipo citolitico, i fenomeni di necrobiosi, di infiltrazione linfocitaria, d'infiltrazione connettivale e di sclerosi, tutti quei fenomeni insomma che sono l'espressione di diminuita vitalità del tessuto.

In tutte e tre le serie dei tumori i fenomeni a tipo citolitico delle zone più superficiali della corteccia neoplastica erano intensi. I lipoidi si trovavano in quantità discreta nei tumori semplicemente irradiati; erano abbondanti e disposti in grandi isole nei tumori infiltrati di lecitina ed irradiati. In tutte e tre le serie poi i fatti di citolisi erano più spiccati e la quantità di lipoidi più abbondante che nel sarcoma di ratti controllo.

Se non che bisogna tener presente che nei ratti trattati con iniezioni intraneoplastiche di lecitina i lipoidi apparivano abbondanti appunto perchè immessi nel tumore, quindi il reperto perde per essi di valore. Restava da considerare il fatto che per i tumori infiltrati di lecitina ed irradiati la corteccia neoplastica si mostrava sottilissima, più sottile che nei tumori semplicemente infiltrati di lecitina e di più i primi erano ulcerati.

Ma ulcerati erano anche in due casi i tumori semplicemente irradiati, e si sa, del resto, che l'ulcerazione è frequente nel tumore sperimentale e non è in rapporto colla grossezza del blastoma. L'unico elemento sul quale possiamo basare una impressione positiva circa la sensibilizzazione del tumore del ratto alla irradiazione per mezzo della lecitina è adunque la grande sottigliezza alla quale fu ridotta la buccia neoplastica nei

tumori infiltrati di lecitina ed irradiati. Importantissimo sarebbe stato ricercare col trapiantamento il potere di attecchimento dei tumori trattati con lecitina ed irradiati in confronto di quelli semplicemente iniettati di lecitina od irradiati; sfortunatamente non ho pensato di praticare tali indagini al momento opportuno.

V. — Sull'azione del siero di sangue di ratto sottoposto in vitro alle emanazioni del radium, sull'attecchimento e sullo sviluppo del sarcoma del ratto.

L'azione dell'irradiazione sul sangue e specialmente sui leucociti (Werner [20], Ollino [21]) mi ha invogliato a compiere qualche ricerca sul modo di agire del siero di sangue del ratto sottoposto in vitro alle emanazioni del radium sull'attecchimento e sullo sviluppo del sarcoma.

Venti ratti maschi giovani sono inoculati sotto la cute del dorso con sarcoma di ratto molto virulento. Dopo due giorni, tre ratti *a*) sani ed integri vengono salassati ed il sangue è raccolto in tre tubetti di vetro sterili e sottoposto alla dose di 520 milligrammi ora di radium. Altri tre ratti *b*) sani ed integri vengono salassati ed il sangue è raccolto in tre tubetti di vetro sterili. Il siero di sangue dei tre ratti *a* è iniettato alla dose di 2 cc. a ciascuno di cinque ratti inoculati due giorni prima con sarcoma. Lo siero di sangue dei tre ratti *b* è iniettato nella medesima dose a ciascuno di cinque ratti inoculati due giorni prima con sarcoma. Gli altri dieci ratti sono tenuti come controllo.

Dopo sette giorni viene ripetuta a cinque ratti iniettati con siero irradiato una iniezione di siero nella medesima dose e trattato nello stesso modo. Ai cinque ratti iniettati con siero di sangue normale viene ripetuta la medesima iniezione.

I ratti delle due serie hanno aspetto deperito rispetto ai controlli.

Sedici giorni dopo l'inoculazione degli animali, si osserva che:

1°) I cinque ratti iniettati con siero di sangue trattato con radium presentano tumore della seguente grossezza:

1° seme di granturco, 2° idem, 3° idem, 4° negativo, 5° negativo.

2°) I cinque ratti iniettati con siero di sangue normale presentano tumore della seguente grossezza:

1° seme di granturco, 2° fagiuolo, 3° fagiuolo, 4° grano di riso, 5° negativo.

3°) I dieci ratti di controllo presentano tumore della seguente grossezza:

1° seme di granturco, 2° idem, 3° idem, 4° idem, 5° idem, 6° idem, 7° grano di riso, 8° idem, 9° negativo, 10° negativo.

Sette giorni dopo la seconda iniezione i cinque ratti iniettati già due volte con siero di sangue radiumtrattato vengono di nuovo iniettati con la medesima dose di siero di sangue che ha subìto 1200 milligrammi ora di radium. I cinque ratti iniettati già due volte con siero di sangue normale sono di nuovo iniettati colla medesima dose di siero di sangue normale.

Sette giorni dopo questa nuova iniezione, gli animali presentano tumore della seguente grossezza:

1° I cinque ratti iniettati con siero di sangue sottoposto alle emanazioni radium:

1° piccolo fagiuolo, 2° bel fagiuolo, 3° idem, 4° idem, 5° negativo.

2°) I cinque ratti iniettati con siero di sangue normale:

1° seme di granturco, 2° bel fagiuolo, 3° mezza noce, 4° idem, 5° negativo.

3°) I dieci ratti di controllo:

1° seme di granturco, 2° idem, 3° fagiuolo, 4° idem, 5° grosso fagiuolo, 6° idem, 7° due fagiuoli, 8° idem, 9° negativo, 10° negativo.

Trentotto giorni dopo l'ultima iniezione i cinque ratti già iniettati con siero di sangue sottoposto alle emanazioni radium, sono nuovamente iniettati colla stessa dose di siero di sangue sottoposto all'intensità di 3750 milligrammi ora di radium. I cinque ratti già iniettati con siero di sangue normale vengono iniettati ancora con la stessa dose di siero di sangue normale. Gli animali, tredici giorni dopo questa nuova iniezione, presentano tumore della seguente grossezza:

1°) I cinque ratti iniettati con siero di sangue radiumtrattato:

1° grossa nocciuola, 2° idem, 3° ciliegia, 4° susina, 5° negativo.

2°) I cinque ratti iniettati con siero di sangue normale:

1° bella nocciuola, 2° idem, 3° noce, 4° grossa noce, 5° negativo.

3°) I dieci controlli:

1° seme di nocciuola, 2° idem, 3° nocciuola, 4° idem, 5° idem, 6° grossa noce, 7° idem, 8° susina, 9° negativo, 10° negativo.

Quindici giorni dopo l'ultima iniezione i cinque ratti già iniettati con siero di sangue sottoposto alle emanazioni di radium vengono di nuovo iniettati colla stessa dose di siero di sangue che ha subìto 3600 milligrammi ora di radium.

I cinque ratti già iniettati con siero di sangue normale sono di nuovo iniettati colla stessa dose di siero di sangue normale.

Ventitrè giorni dopo questa ultima iniezione gli animali fortemente deperiti sono sacrificati ed allora il peso dei tumori è il seguente:

per i cinque ratti iniettati con siero di sangue radiumtrattato, rispettivameute gr. 15, 20, 25, 24, 0;

per i cinque ratti iniettati con siero di sangue normale, rispettivamente gr. 30, 32, 45, 55, 0;

per i dieci ratti controllo, rispettivamente gr. 40, 42, 50, 53, 41, 49, 50, 85, 0, 0.

Riproduco la fotografia dei tumori delle tre serie dalla quale appare evidente la differenza abbastanza grande macroscopica tra le due prime serie e la terza. I tumori degli otto animali della terza serie erano tutti molto voluminosi; ne ho riprodotti due nella fotografia. (V. tav. VIII).

Da tutto questo si deduce che, se fra le tre serie di ratti non vi è differenza per quanto riguarda l'attecchimento del sarcoma, risultandone la medesima percentuale di casi negativi, la differenza è invece apprezzabile per quanto si riferisce allo sviluppo del sarcoma poichè noi vediamo che accanto ai pesi complessivi di gr. 84 per i tumori dei ratti iniettati con siero di sangue radiumtrattato, si ha gr. 162 per i tumori dei ratti iniettati con siero di sangue normale e gr. 410 (gr. 205 per quattro ratti) per gli otto ratti controllo. Adunque l'inie-

zione di siero di sangue radiumtrattato in vitro riduce più che discretamente lo sviluppo del sarcoma del ratto. Come si può spiegare il fenomeno? Bisogna ricordare a questo proposito che i leucociti sono molto sensibili alle emanazioni del radium per la loro ricchezza in lecitina la quale sostanza è particolarmente recettiva delle emanazioni stesse (Werner) [22]. Essa poi sotto l'azione dei raggi dà luogo come prodotto di scissione alla colina che ha sui tumori da innesto un'azione decisamente involutiva. Ollino [23] ha inoltre dimostrato che l'irradiazione degli elementi ematici in vitro ha un'influenza indiscutibile sul globulo bianco e ne determina più o meno celermente la morte, di più che i leucociti irradiati causano a loro volta la morte dei leucociti integri messi a loro contatto.

I ricercatori sono venuti nell'opinione che l'agente tossico non si desti direttamente in seguito alla irradiazione, ma che sia una sostanza producentesi secondariamente dai corpi dei leucociti stessi irradiati (röntgenleucotossina).

Sappiamo poi anche che la irradiazione del ratto rende questo meno recettivo all'innesto del sarcoma per un meccanismo complesso a chiarire il quale si può avanzare l'originale idea del Busi [24] che è quella di ammettere che probabilmente i raggi Röntgen non agiscono soltanto sulle cellule, ma anche sui succhi extracellulari, tanto è vero che la pelle può essere desensibilizzata sia coll'anemia da compressione (Schwarz), sia coll'adrenalina (Reicher e Leutz) (azione indiretta dei raggi X secondo Kimball e Frankl).

Per spiegare l'azione del siero di sangue sottoposto in vitro alle emanazioni del radium sulla evoluzione del sarcoma del ratto, azione che le nostre ricerche hanno accertato nel senso che lo sviluppo del tumore è discretamente ridotto, possiamo adunque ammettere che essa sia dovuta alla röntgenleucotossina, oppure alla lecitina dei leucociti distrutti sciolta nel siero di sangue la quale è in grado di esplicare un'azione radioattiva sull'animale portatore di tumore, alla colina derivata dalla lecitina (Benjamin, von Reuss, Sluka), alla ematoporfirina derivata dalla emoglobina (Linsar) e finalmente al semplice siero di sangue sottoposto all'azione del radium del che potremmo accertarci trattando con radium il solo siero del sangue.

Infine queste nostre esperienze hanno messo in rilievo che lo sviluppo dei tumori dei ratti iniettati con siero di sangue di ratto normale è un po' minore che non nei ratti controllo. Sembrerebbe così che il siero di sangue di ratto normale iniettato nei ratti portatori di tumore eserciti un potere oncolitico, potere che sappiamo si esplica in vitro come hanno dimostrato le ricerche di Gussio [25] confermate da Hirschfeld [26] e come risulta anche da esperienze di Caan [26].

VI. — Sull'azione dei raggi X e delle emanazioni di radium sul sarcoma del ratto fuori dell'organismo.

Le ricerche di Wassermann [27], Oscar Gunther, Hertwig, Halberstaedter, Frankl e Kimball [28], hanno dimostrato che le sostanze radioattive agiscono sulle cellule del cancro, sugli spermatozoi, sui tripanosomi in modo che la riproduzione di questi elementi diventa impossibile mentre la loro funzione di nutrizione e la vitalità restano conservate.

Avendo io potuto per gentile concessione del prof. Bertolotti, direttore dell'Istituto di radiologia dell'ospedale di S. Giovanni, servirmi di ampolle Röntgen e di placche di radium per lo studio dell'azione di queste emanazioni sul sarcoma del ratto isolato dall'organismo riferisco quanto ho potuto osservare col mio modo di sperimentare:

a) Alcuni piccolissimi frammenti freschi di sarcoma di ratto (di circa 2-3 mm. di diametro) vennero raccolti sterilmente in una capsula di Petri contenente liquido di Ringer e sottoposti a 150 milligrammi ora di radium. Altri frammenti furono sottoposti nelle medesime condizioni ad una dose di irradiazione X pari a 20 H. Altri furono tenuti in ghiacciaia durante due ore. Trascorso tale periodo di tempo si procedette :

1° All'innesto sotto la cute del dorso di tre ratti di un frammento di sarcoma radiumtrattato.

2° All'innesto sotto la cute del dorso di tre ratti di un frammento di sarcoma trattato colla röntgenizzazione.

3° All'innesto sotto la cute del dorso di quattro ratti, di un frammento di sarcoma tenuto due ore in ghiacciaia.

Tutti i ratti erano del medesimo sesso e precisamente maschi ed adulti.

Dopo 21 giorni i tre ratti inoculati con frammenti di tumore radiumtrattati non presentavano alcun accenno all'attecchimento del tumore, al pari dei quattro ratti inoculati con frammenti di tumore tenuti in ghiacciaia durante due ore; dei tre ratti inoculati con frammenti di tumore röntgenizzati, solo uno era portatore di un piccolissimo tumore.

Dopo altri 17 giorni, i quattro ratti controllo sono negativi; dei tre ratti inoculati con frammenti di tumore röntgenizzati, uno risulta portatore di un tumoretto grosso come un fagiuolo, mentre due sono negativi; dei tre inoculati con frammenti radiumtrattati, uno è negativo, l'altro ha tumore grosso come un fagiuolo, il terzo come una nocciuola.

Dopo altri 26 giorni, dei tre ratti inoculati con frammenti sottoposti alle emanazioni radium uno è negativo, il secondo presenta un tumore della grossezza di una noce, duro, solido, il terzo è portatore di un tumore un po' più piccolo del precedente e cistico. Dei tre ratti inoculati con frammenti di tumore röntgenizzati, due sono negativi ed il terzo è affetto da tumore piccolissimo, fibroso. I quattro controlli sono negativi.

Riassumendo:

Ratti adulti	Dopo 21 giorno	Dopo altri 17 giorni	Dopo altri 26 giorni
3 Inoculazione con frammenti di sarcoma sottoposti alle emazioni radium (150 milligrammi ora)	— — —	+ (fagiuolo) — + (nocciuola)	— + (gr. 15) + (gr. 10)

Ratti adulti	Dopo 21 giorno	Dopo altri 17 giorni	Dopo altri 26 giorni
3 Inoculazione di frammenti di sarcoma sottoposti alla röntgenizzazione (20 H.)	— — — + (piccolissimo)	— — — + (fagiuolo)	— — — + (gr. 1.5)
4 Controlli: inoculazione di frammenti di sarcoma tenuti due ore in ghiacciaia	— — — —	— — — —	— — — —

Ne risulta che la permanenza in ghiacciaia di piccoli frammenti di sarcoma di ratto durante due ore ha impedito *in queste esperienze* l'attecchimento di essi in ratti maschi adulti. Wassermann che ha ricercato *sul carcinoma* del topo per quanto tempo il tumore può essere mantenuto vivente fuori dell'organismo, ha trovato che anche quattro ore e mezza dopo il prelevamento dall'organismo, l'inoculazione di un frammento di tumore dava risultato positivo.

Noi, dopo due ore, abbiamo avuto *per il sarcoma* del ratto *in questa serie di esperienze*, risultato negativo.

Accanto al risultato negativo di frammenti di sarcoma così trattati, abbiamo i reperti positivi della inoculazione di frammenti di sarcoma röntgenizzati o sottoposti alle emanazioni del radium. Anzi, i frammenti di sarcoma trattati con 150 milligrammi ora di radium hanno dato sviluppo a tumori più frequentemente ed a più spiccato accrescimento di essi, che non frammenti dello stesso tumore röntgenizzati con 20 H.

b) Nella seguente serie di esperienze ho proceduto così:

Ho inoculato:

1° 7 ratti con piccoli frammenti di sarcoma che erano sottoposti in liquido di Ringer, a 776 milligrammi ora di radium;

2° 7 ratti con piccoli frammenti di sarcoma sottoposti in liquido di Ringer a 30 H di irradiazione Röntgen;

3° 8 ratti con piccoli frammenti di sarcoma tenuti in ghiacciaia in liquido di Ringer durante 7 ore.

L'inoculazione venne praticata per tutti i tre gruppi di animali, sette ore dopo il sacrificio del giovane ratto dal quale era stato prelevato il tumore. Si fa notare che anche i ratti di queste esperienze erano tutti di sesso mascolino, di più essi erano in via di accrescimento.

Dopo 24 giorni si trova: che i 7 ratti inoculati con frammenti di sarcoma sottoposti all'azione di 776 milligrammi ora di radium, non presentano alcun attecchimento del tumore; il medesimo reperto si ha per i 7 ratti inoculati con frammenti di sarcoma sottoposti alla röntgenizzazione; degli 8 ratti inoculati con frammenti di sarcoma conservati in ghiacciaia durante sette ore, uno presenta un tumore della grossezza di un seme di granturco e muore lo stesso giorno, in uno il reperto è negativo, in sei il tumore è attecchito e precisamente il tumore è in 5, della grossezza di una nocciuola, ed in uno della grossezza di una noce.

Tutti questi tumori sono di consistenza uniformemente carnosa.

Dopo altri 16 giorni si trova: che dei 7 ratti inoculati con frammenti di sarcoma radiumtrattati, nessuno presenta attecchimento del tumore; dei 7 ratti inoculati con frammenti di tumore röntgenizzati, in 5 non vi è alcun accenno ad attecchimento del tumore, in uno il tumore è grosso come un seme di nocciuola, carnoso, in uno è della grossezza di una piccola noce, carnoso; dei 7 ratti superstiti inoculati con frammenti di sarcoma conservati in ghiacciaia, in uno il reperto è negativo, in 4 il tumore è grosso come una bella noce, in uno è come una susina, in uno è come una pera. La consistenza è in tutti carnosa.

Dopo altri 28 giorni gli animali vengono sacrificati ed allora i ratti del primo gruppo presentano sempre reperti negativi, in quelli del secondo i tumori pesano rispettivamente gr. 20, 10, 12, 24, 9, 12, 0; in quelli del terzo, pesano gr. 0.29, 32, 26, 34, 23, 41.

Riassumendo:

Ratti giovani	Dopo 24 giorni	Dopo altri 16 giorni	Dopo altri 28 giorni
7 Inoculazione di frammenti di sarcoma sottoposti alle emanazioni del radium (776 milligrammi ora)	— — — — — — —	— — — — — — —	— — — — — — —
7 Inoculazione di frammenti di sarcoma sottoposti alla röntgenizzazione (30 H.)	— — — — — — —	— — — — — + nocciuola + piccola noce	— + (gr. 20) + (gr. 10) + (gr. 12) + (gr. 24) + (gr. 9) + (gr. 12)
8 Controlli: animali inoculati con frammenti di sarcoma conservati in ghiacciaia durante sette ore	— + seme granturco + nocciuola + nocciuola + nocciuola + nocciuola + nocciuola + noce	— + bella noce + bella noce + bella noce + bella noce + susina + pera	— + (gr. 29) + (gr. 32) + (gr. 26) + (gr. 34) + (gr, 23) + (gr. 41)

La tav. IX ci dà un' idea del reperto dei tumori delle tre serie.

Dobbiamo adunque riconoscere che una dose di 776 milligrammi ora di radium agisce su frammenti di circa tre millimetri di lato di sarcoma del ratto, in modo da impedire l'attecchimento in seguito alla inoculazione di essi in ratti maschi giovani; che una dose di röntgenizzazione equivalente a 30 H agisce su frammenti di sarcoma di ratto in modo da determinare in seguito alla inoculazione in ratti maschi giovani, un tardivo attecchimento ed un più che discreto sviluppo del tumore; che sette ore di permanenza di piccoli frammenti di sarcoma di ratto in ghiacciaia permettono l' attecchimento di questi frammenti in sette casi sopra otto ed il rapido sviluppo del tumore.

I reperti della serie *b* per quel che riguarda l' inoculazione di frammenti di sarcoma radiumtrattati o röntgenizzati costituiscono una prova evidente di quell' azione diretta delle radiazioni affermata da Wasser-

mann, da Frankl e Kimball. Ed infatti i frammenti radiumtrattati fuori dell'organismo non sono attecchiti e quelli röntgenizzati hanno presentato un tardivo attecchimento.

Dal confronto dei reperti della serie *b* con quelli della serie *a* rileviamo che, mentre per la serie *a* i frammenti di sarcoma sottoposti all'azione di 150 milligrammi–ora di radium sono attecchiti in due casi sopra tre, per la serie *b* i frammenti sottoposti all'azione di 776 milligrammi ora di radium non sono per nulla attecchiti; per la serie *a* i frammenti röntgenizzati (20 H) hanno dato attecchimento rapido in un caso su tre, per la serie *b*, i frammenti röntgenizzati (30 H) hanno dato attecchimento tardivo in sei casi.

Adunque, l'azione di 150 milligrammi ora di radium non ha distrutto il genocettore di piccoli frammenti del sarcoma del ratto, distruzione che si è avverata con la dose di 776 milligrammi ora. Quanto poi all'azione della röntgenizzazione si avrebbe un reperto paradossale, giacchè ne risulterebbe che la dose di 30 H di raggi *X* agirebbe sui frammenti di sarcoma in modo meno dannoso di quello di 20 H (6 attecchimenti sopra 7, in confronto di uno su tre). Si deve però tener calcolo del fatto che la giovane età dei ratti inoculati deve avere agevolato nella serie *b* l'attecchimento dei frammenti nei quali il genocettore ha per altro sofferto non poco dal momento che vediamo essersi manifestato ben tardi l'attecchimento. L'influenza favorevole della giovane età dell'ospite sulla trasmissione neoplastica è stata sperimentalmente dimostrata da molti ricercatori: Brashford e Murray, Lewin, Gussio [29], ecc.

Finalmente il reperto dei frammenti tenuti in ghiacciaia due e sette ore, sembra esso pure paradossale perchè nella serie *a* si ebbero quattro casi negativi sopra quattro animali inoculati, mentre nella serie *b* i reperti furono positivi 7 volte sopra 8 casi; nella serie *a*, nutricettore e genocettore andarono distrutti, nella serie *b*, la sofferenza è stata debole. La spiegazione del fenomeno non è facile ed io ricorro ad ipotesi e mi domando se, entro certi limiti, ogni tumore non possa avere uno speciale grado di resistenza in rapporto colla età, coll'epoca dello sviluppo e collo stato di nutrizione del soggetto che lo portava al mo-

mento in cui il tumore venne prelevato per l'inoculazione e se la giovane età dei ratti della serie *b* rispetto a quella dei ratti della serie *a* nella quale gli animali erano giunti al loro completo sviluppo al momento della inoculazione, non abbia favorito l'attecchimento nei ratti della serie *b* malgrado una sofferenza dei frammenti tenuti sette ore in ghiacciaia.

Del resto, già il metodo bioscopico di Neisser mi ha dimostrato che, anche dopo sette ore di permanenza in ghiacciaia, i frammenti di sarcoma di ratto restano vitali al pari di quelli trattati colla röntgenizzazione e colle emanazioni del radium. Come è noto, questo metodo è fondato sul fatto che, se si pongono delle cellule viventi in soluzione fisiologica colorata leggermente con bleu di metilene e si ricopre la soluzione stessa con paraffina liquida, il bleu di metilene viene ridotto dall'azione dell'ossigeno proveniente dalle cellule viventi e la sostanza colorante resta decolorata. La soluzione di bleu di metilene in tubetti contenente frammenti di sarcoma röntgenizzati o trattati colle emanazioni radium o tenuti in ghiacciaia durante sette ore, già qualche ora dopo, ma specialmente dopo 24 ore, era decolorata e precisamente la soluzione di bleu di metilene contenente i frammenti trattati con radium era profondamente decolorata al pari di quella contenente i frammenti conservati in ghiacciaia; un po' meno decolorata era la soluzione contenente i frammenti trattati colla röntgenizzazione.

La vitalità del sarcoma di ratto in poltiglia conservata in ghiacciaia risulta anche dalle ricerche di Gussio [30] il quale dopo 29 e 48 ore di conservazione della poltiglia stessa in soluzione fisiologica in ghiacciaia ha ottenuto attecchimento del tumore e da altre ricerche di questo autore [31] secondo le quali il tessuto sarcomatoso che ha subìto l'azione del freddo a 8° C., se innestato, può generare tumori fino a 15 giorni dopo.

Decolorazioni della soluzione di bleu ho ottenuto anch' io con frammenti di sarcoma di topo conservati in ghiacciaia tre e quattro giorni. Naturalmente mi accertavo della sterilità dei frammenti mediante coltura in brodo e su agar e lo stesso facevo per le soluzioni di bleu dopo avvenuto il fenomeno della decolorazione per non cadere nell' errore

di attribuire alla vitalità delle cellule neoplastiche la riduzione della sostanza colorante che poteva invece essere provocata da microrganismi.

Che il fenomeno della decolorazione fosse dovuto realmente alla vitalità delle cellule tumorali era provato, oltre che dalla sterilità delle colture, anche dalla immersione nella soluzione colorata, di frammenti di sarcoma uccisi dopo breve bollitura: essi si presentavano fortemente colorati in bleu alla periferia, ma la soluzione non subiva alcuna alterazione.

Adunque, accanto ad una grande, costante resistenza del nutricettore del sarcoma del ratto abbiamo constatato la morte del genocettore in una serie di esperienze già dopo due sole ore di permanenza in ghiacciaia dei frammenti di sarcoma, la quale constatazione conferma il valore di fattori speciali e casuali sopra accennati, dal momento che, oltre ai citati reperti di Gussio, anche in numerose esperienze compiute dai miei colleghi di Clinica e da me si è riconosciuto l'attecchimento della inoculazione della poltiglia di sarcoma conservata in ghiacciaia anche due, tre e più giorni.

Un breve accenno farò ad alcune mie esperienze sulla iniezione di poltiglia di sarcoma di ratto nella cavità articolare del ginocchio.

In otto ratti ho iniettato nell'articolazione del ginocchio una poltiglia fresca di sarcoma. L'iniezione richiede una certa pratica. In qualche caso, per meglio assicurarmi della riuscita, ho aperto la giuntura col bisturi ed ho deposto un piccolo frammento di poltiglia nel cavo articolare suturando poi i tessuti. Sopra otto animali, il tumore si sviluppò tre volte nella coscia. Dopo un mese, questa era fortemente tumefatta; il tumore andò poi continuamente aumentando fino ad assumere, dopo 45 giorni, il volume di un piccolo uovo. Sacrificati gli animali si constatò che il sarcoma aveva dissociato ed infiltrato le masse muscolari e che era parzialmente necrotico. Però l'articolazione era sana e le cartilagini di incrostazione erano integre. In un caso si trovò nella epifisi tibiale un nodetto di sarcoma (riconosciuto tale istologicamente) innicchiato dentro la sostanza ossea, evidentemente prodotto da infissione dell'ago da iniezione nell'atto in cui si tentava di far penetrare nel cavo articolare del ginocchio la poltiglia sarcomatosa. Non si sono osservate

metastasi viscerali, a differenza di quanto hanno constatato Lewin e Sittenfield [32] i quali in 15 ratti iniettati nella cavità articolare del ginocchio hanno ottenuto una localizzazione epatica. Questi autori poi esperimentando con poltiglia di sarcoma di ratto, su 24 ratti inoculati nella cavità articolare del ginocchio, hanno rilevato undici attecchimenti con tre metastasi polmonari ed una metastasi polmonare senza lesione locale.

Conclusioni.

I. Quando in ratti portatori di sarcoma si legano i vasi splenici si ha una grande mortalità degli animali. Nei casi di sopravvivenza sembra che la legatura dei vasi splenici possa permettere uno sviluppo maggiore del tumore che nei controlli.

II. I sieri di ratti immunizzati con tessuto cerebrale, epatico e splenico iniettati a più riprese in ratti portatori di sarcoma permettono un maggiore sviluppo del tumore stesso rispetto ai controlli. Sembra che questi sieri ostacolino la funzione di organi e tessuti normali attenuandone il potere oncolitico.

III. L' iniezione di tessuto sarcomatoso sterilizzato in ratti portatori di sarcoma non ha dato risultato apprezzabile sullo sviluppo del tumore. Essa è causa della insorgenza di gravi fenomeni soltanto nell'animale portatore di sarcoma e solo per opera della sostanza tossica del tumore. Di più la tolleranza all' estratto aumenta da parte dell'animale dopo parecchie iniezioni.

IV. Iniezioni intraneoplastiche di una emulsione di lecitina nel sarcoma del ratto possono determinare una sensibilizzazione del tumore alla röntgenizzazione.

V. Il siero di sangue di ratto sottoposto in vitro alle emanazioni del radium influisce sulla evoluzione del sarcoma del ratto riducendone discretamente lo sviluppo rispetto ai controlli.

VI. Frammenti di sarcoma di ratto prelevato dall'organismo e trattati con 150 milligrammi ora di radium hanno dato sviluppo a tumori più frequentemente ed a più spiccato accrescimento di essi che non frammenti dello stesso tumore röntgenizzati con 20 H.

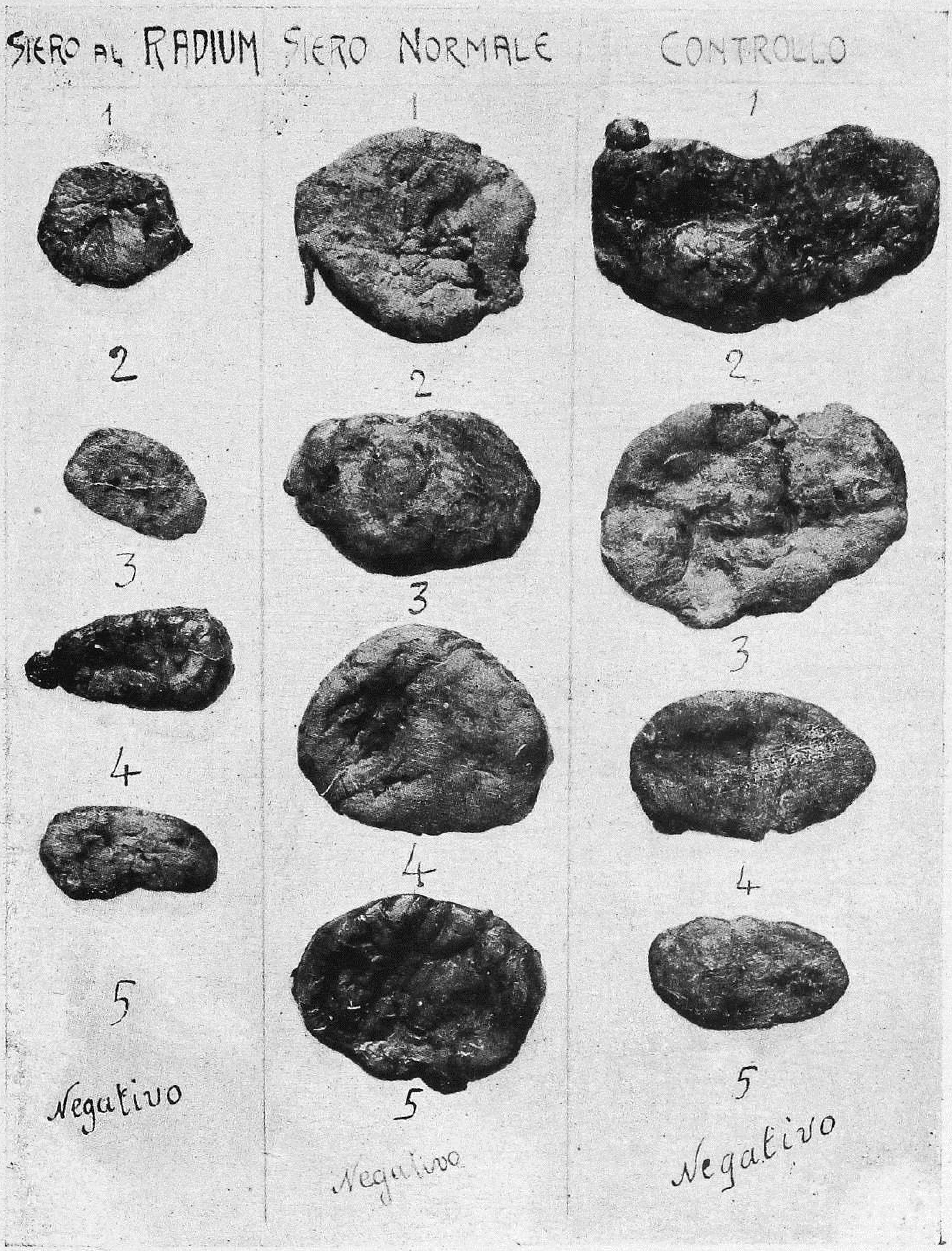
Una dose di 776 milligrammi ora di radium agisce su frammenti di sarcoma di ratto prelevato dall'organismo, in modo da impedire l'attecchimento in seguito alla inoculazione di essi in ratti giovani - una dose di 30 H di röntgenizzazione agisce su frammenti di sarcoma di ratto in modo da permettere in seguito alla inoculazione su ratti giovani un tardivo attecchimento ed un più che discreto sviluppo del tumore.

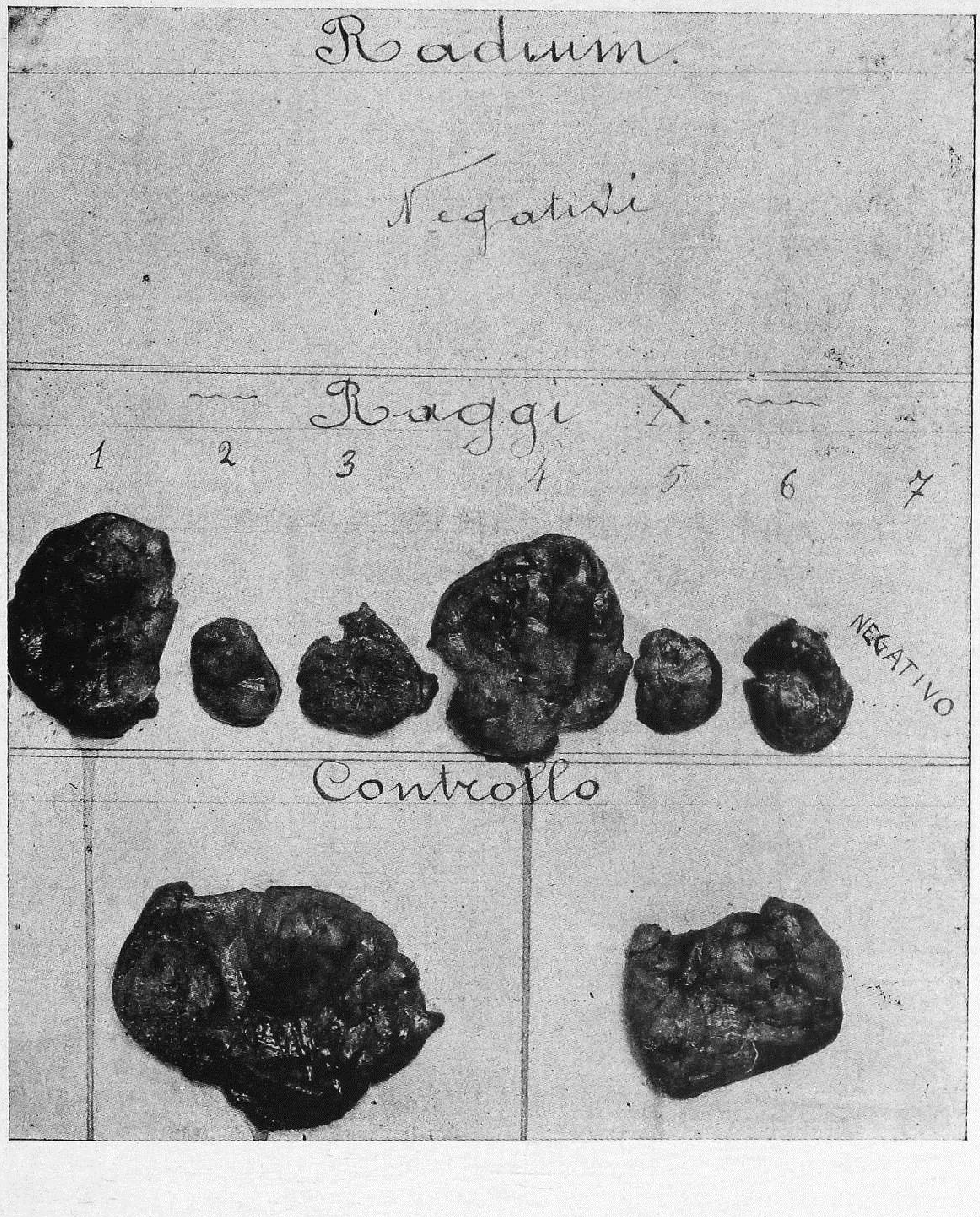
VII. L'inoculazione di poltiglia di sarcoma di ratto nel cavo articolare del ginocchio non ha dato luogo ad attecchimento nell' articolazione stessa.

BIBLIOGRAFIA

1. G. Serafini, *Contributo alla chirurgia del pancreas.* Il Policlinico. S. C. 1915.
2. A. Donati, Archivio per le Scienze mediche, n. 6, 1914.
3. Frankl, Versanml. Naturf. und Aerzte, Wien, Sept. 1913.
4. Oser e Pribram, Zeitsch. für experim. Pathol. und Ther., Bd. XII, 1913.
5. Fichera, *Etiologia del cancro*, Relaz. Soc. Ital. di Chir, 1909.
   — *Controllo e critica in oncologia.* Tumori, fasc. IV, 1913.
   — Tumori. Anno III, fasc. I, pag. 124.
   — *Disquilibrio oncogeno e chemioterapia istogena*, 1908-10.
6. Braunstein, Berlin. klin. Wochensch., n. 45, 1911.
7. Lewin e Meidner, Rassegna bibliografica in Tumori. Anno I, pag. 630.
8. Biach e Weltmann, Wien. klin. Wochensch., n. 27, 1913.
9. Cimoroni, Tumori. Vol. I, pag. 439.
10. Brancati, Tumori. Anno I, pag. 189 - Anno II, pag. 74.
11. S. Mazza, Tumori. Anno II, fasc. III, pag. 259.
12. Apolant, Zeitsch. für Immunitätsforsch., Bd. 17, Ht. 2, 1913.
13. R. Brancati, Tumori. Vol. I, pag. 688.
14. Koenigsfeld, Medizin. Klin., n. 27, 1913, in Tumori, anno III, pag. 295
15. Abderhalden, Medizin. Klin., n. 5, 1914.
16. Niesfield, Ind. med. gaz., n. 8, 1913, in Tumori, novembre-dicembre 1913, pag. 426.
17. Schwarz e Schäper, Zentralblatt f. Chir., 1904, pag. 1237.
18. M. Bertolotti, *Relazione VII Congr. int. Elett. e Rad. med.*, 1914, pag. 12.
19. Robertson e Burnett, Journ. of Experim. med. n. 3, 1913, in Tumori, vol. II, pag. 627.
20. R. Werner, Zentralblatt für Chir., 1914, n. 43.
21. G. Ollino, La Clinica Medica Italiana, 1915, n. 15.
22. R. Werner, loco citato.
23. G. Ollino, loco citato.

24. Busi in Bertolotti, *Relaz. VII Congr. int. Elett. e Rad. med.* 1914, pag. 14.
25. S. Gussio, Tumori. Anno I, pag. 75.
26. Hirschfeld, Tumori. Anno, I, pag. 633.
27. Wassermann, Revue pratique de radiumthérapie, 1914.
28. Frankl e Kimball, Wiener med. Woch., 1914, pag. 1449.
29. S. Gussio, Tumori. Anno II, pag. 173.
30. S. Gussio, Tumori. Anno I, pag. 80.
31. S. Gussio, Tumori. Anno I, pag. 557.
32. Lewin e Sittenfield, Journ. of Experim. med., vol. XIV, n. 2, 1911.


SIERO AL RADIUM
SIERO NORMALE
CONTROLLO
1
1
1
2
2
2
3
3
3
4
4
4
5
5
5
Negativo
Negativo
Negativo


Radium.
Negativi
Raggi X.
1 2 3 4 5 6 7
NEGATIVO
Controllo